

# Trabajo Fin de Máster



## **Evaluación de la respuesta inflamatoria al xenoinjerto de células madre mesenquimales de origen de pulpa dental. Estudio piloto.**

Máster en Ciencias Odontológicas.  
Facultad de Odontología. UCM.

Autor: Pablo García Cañas  
Tutor: Prof. Dr. Luis Blanco Jerez

# Índice

Agradecimientos.....	3
Introducción.....	4
Justificación.....	9
Hipótesis de trabajo.....	10
Objetivos.....	11
Ética.....	12
Material y método.....	13
Resultados.....	20
Discusión.....	26
Conclusiones.....	28
Bibliografía.....	29

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Profª María del Pilar García Rebollar, Departamento de Producción Animal ETS de Ingenieros Agrónomos, su constante colaboración y apoyo en la granja experimental como experta veterinaria.

Agradezco al Dr. D. José Ramón Ramírez, Jefe de Servicio de Anatomía Patológica del Hospital del Tajo (Aranjuez), su colaboración y permanente disponibilidad como experto en diagnóstico histológico.

## Introducción

La regeneración ósea se ha convertido en una necesidad para multitud de terapias médicas. Los últimos avances en medicina regenerativa, ingeniería tisular y cirugía reconstructiva han demostrado la utilidad de células madre mesenquimales en aumentos óseos. La literatura describe ampliamente estas células como importantes herramientas terapéuticas para curar enfermedades y reemplazar tejidos perdidos, incluyendo el hueso.

Según la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) las células madre mesenquimales (CMM) se definen sobre la base de tres características principales: (1) su adhesión a plásticos, (2) la expresión de un conjunto específico de epítomos de membrana (por ejemplo: CD73 , CD90, CD105), junto con la falta de expresión de los marcadores hematopoyéticos (por ejemplo: CD14, CD34, y CD45) y el antígeno leucocitario humano DR (HLA-DR), y (3) su capacidad de diferenciarse en linajes de células mesenquimales: osteoblastos, condrocitos, fibroblastos y adipocitos. Otras características incluyen autorrenovación, hipoinmunogenicidad, haciéndolos hipotéticamente aptos para el trasplante alogénico, y su capacidad de producir inmunosupresión del trasplante.<sup>1</sup>

En el área maxilofacial es frecuente la necesidad de reparación de defectos óseos, desde pequeños defectos, hasta abarcar áreas que afectan a varios huesos del macizo maxilofacial, a causa de problemas congénitos, traumas, procesos infecciosos o lesiones quísticas y tumorales. La reparación de defectos óseos sigue siendo un reto de



muchos procedimientos reconstructivos. Las células madre han demostrado, en numerosos estudios, ser útiles en estas terapias de regeneración de tejidos duros en deformidades craneofaciales.<sup>2, 3, 4, 5, 6, 7, 8</sup> La medicina regenerativa o ingeniería de tejidos se presenta como una de las grandes promesas para la regeneración y renovación de las funciones perdidas por tejidos óseos dañados, bien por enfermedades hereditarias o bien por lesiones sufridas a lo largo de la vida del individuo. La herramienta principal de la medicina regenerativa es la terapia celular.<sup>9</sup>

El modelo animal para regeneración ósea es ampliamente utilizado en la bibliografía. Estudios de aumentos o regeneración ósea sobre modelo de conejos han tenido resultados satisfactorios.<sup>10, 11, 12, 13</sup> Para poder realizar estudios de regeneración ósea mediante células madre mesenquimales humanas sobre conejos, deberemos previamente asegurarnos de que la inoculación de las misma sobre estos animales no produce respuesta inflamatoria.

Se empieza a comprender el potencial de las células madre mesenquimales en la terapia celular para regeneración del tejido dañado en el cuerpo.<sup>14</sup> Capaces de diferenciarse en cualquiera de las líneas de células mesenquimales, sin embargo estas células se enfrentan a los problemas de producción tumoral y rechazo inmunológico.<sup>15</sup>

En la actualidad, el uso de células madre autólogas tiene como objetivo evitar el hipotético rechazo inmunológico de células madre de origen alogénico o xenogénico. A pesar de los primeros resultados prometedores, la recolección autóloga de células madre sigue planteando problemas logísticos, económicos y limitaciones de tiempo.

Además, la mayoría de pacientes que se benefician de terapias con células madre son los ancianos, con múltiples comorbilidades médicas. Desafortunadamente, una serie de estudios recientes han documentado que las CMM obtenidas de pacientes de edad avanzada, demuestran una capacidad significativamente reducida para la proliferación, diferenciación y neovascularización, con niveles elevados de apoptosis “*in vitro*” e “*in vivo*”. Por tanto, tal deterioro podría limitar el potencial terapéutico de estas.<sup>16</sup>

El uso de “células donantes universales” de pacientes jóvenes sanos podría ser utilizado como alotrasplante de células madre sin necesidad de terapias inmunosupresoras y evitando los inconvenientes de las primeras.<sup>17</sup>

La aplicación potencial de estas células a seres humanos deberá resolver previamente el hipotético problema del rechazo del injerto para no mantener necesariamente al paciente de por vida sometido a una inmunosupresión; las terapias inmunosupresoras reducen la capacidad regeneradora de las células madre, además de añadir el peligro de no poder hacer frente a infecciones o combatir posibles tumores en una situación de bajas defensas del organismo. Se trabajan diferentes vías para manipular las células antes de su posible transferencia, como eliminar los antígenos Complejo Histocompatibilidad Mayor (MHC) extraños, o reemplazarlos.<sup>18,19</sup>

Otro de los problemas que existen en cuanto a células madre es que en los laboratorios de todo el mundo no existe una metodología internacional estandarizada para obtención y expansión “*in vitro*” de células madre.<sup>14</sup>

Las CMM son ampliamente utilizadas y estudiadas por su potencial clínico, fácil obtención y propiedades inmunosupresoras.<sup>20</sup> Sin embargo, esta última propiedad podría mostrar efectos adversos en ciertas circunstancias, como la promoción del crecimiento de un tumor.<sup>21</sup> De ellas, las de origen de médula ósea son las más utilizadas por su capacidad inmunomoduladora.<sup>22</sup> Dicha propiedad se le atribuye a los bajos niveles de MHC-I y ausencia de MHC-II, según se ha demostrado.<sup>15</sup>

Las células madre de origen de pulpa dental son una alternativa prometedora para la ingeniería tisular. Las células madre de origen pulpar pueden ser estimuladas para diferenciarse, en condiciones específicas, hacia diversos tipos de células (mioblastos, neuronas, condroblastos, osteoblastos, etc). Su amplia gama de diferenciación le hace una prometedora herramienta para la regeneración de tejidos perdidos o dañados. Esta característica puede estar relacionada por el origen del que proceden, la cresta neural. Para su obtención se requieren técnicas poco invasivas. Esta ventaja, unida a su gran potencial de diferenciación, hacen de las células madre de origen de pulpa dental una buena alternativa de uso para terapia celular.<sup>23</sup>

Se pueden extraer a partir de pulpas de órganos dentarios exfoliados (piezas de dentición infantil) o de piezas dentarias sanas extraídas con fines ortodónticos y terceros molares. La pulpa dental está conformada de componentes ectodérmicos y mesenquimales, contiene células de la cresta neural de las que se ha demostrado capacidad multipotencial.<sup>24</sup>

Los riesgos de formación de tumores y rechazo inmune después del trasplante de células madre son siempre una preocupación. Las células madre mesenquimales y embrionarias *in vitro* presentan una fuerte inmunosupresión sobre linfocitos e incluso las segundas en estudios anteriores informan de que tienen potencial para generar tumores.<sup>25</sup>

## **Justificación**

El avance en terapia celular supone una gran ventaja para la regeneración del tejido óseo maxilofacial. Para realizar más estudios que nos permitan observar y confirmar esta capacidad regenerativa ósea de las células madre mesenquimales humanas, necesitamos verificar primero la ausencia de respuesta inflamatoria por parte del modelo animal ante el trasplante de dichas células. Para ello proponemos en este trabajo el uso de células madre de origen de pulpa dental humana, procedente de dientes temporales y dientes permanentes, para el uso de terapia celular regenerativa en un modelo de trasplante xenogénico (conejos). Y así comprobar la capacidad de respuesta de los tejidos ante la introducción de este tipo de células madre, viendo si se produce reacción inmunológica como objetivo principal.

## **Hipótesis de trabajo**

Considerando a las células madre mesenquimales como células hipoinmunogénicas,<sup>26</sup> nuestra hipótesis de trabajo será: el trasplante de células madre mesenquimales de origen humano a un receptor animal xenogénico (conejo) no produce una respuesta inmunológica.

## Objetivos

Las evaluaciones de la respuesta inflamatoria se realizan a distintos tiempos, para poder observar posibles diferencias de la reacción del organismo al trasplante, desde 48 horas posterior a la inoculación de las células como una hipotética respuesta inmediata, hasta 14 días post trasplante, ya que se realizan en tejido celular subcutáneo y no esperamos observar signos inflamatorios más allá de ese tiempo debido a su alta tasa de metabolismo celular.

Por lo tanto, los objetivos son:

- Evaluar la respuesta inflamatoria que produce el trasplante xenogénico de células madre humanas de origen pulpar de diente adulto en el animal de experimentación.
- Evaluar la respuesta inflamatoria que produce el trasplante xenogénico de células madre humanas de origen pulpar de diente temporal en el animal de experimentación.
- Evaluar la respuesta inflamatoria que produce el trasplante xenogénico de células humanas diferenciadas (osteoblastos) en el animal de experimentación.

## **Ética**

Proyecto presentado al Comité Ético de Investigación de la Universidad Politécnica de Madrid que tras valoración del equipo investigador, la metodología y los fines, no hubo inconveniente en informar favorablemente la propuesta, recomendando el efectivo cumplimiento de los compromisos declarados.



## Material y método

Para realizar este estudio piloto experimental animal se necesitó:

### Animales de experimentación

4 Conejas (*Oryctolagus cuniculus*) híbridas (Neozelandés blanco x Californiano) nulíparas de 3,5 meses de edad, de 3,25 kg de media, alojadas en la granja experimental de la E.T.S.I. Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM) a 20-25 °C, 16HL:8HO. Se cumplieron estrictamente las normas vigentes respecto al alojamiento y a los cuidados de animales destinados a la experimentación (86/609/CEE).

Por no encontrarse publicaciones científicas previas relacionadas directamente con los objetivos del presente trabajo se realizó un estudio piloto con un tamaño muestral total de 4 animales por cada uno los cuales se inocularan un total de 9 muestras. En función de los resultados obtenidos en este estudio preliminar, según la magnitud de los efectos observados, se hará un cálculo del tamaño muestral para diseñar un estudio definitivo.

En cada animal se ensayaron 2 líneas celulares, y en todos ellos el control negativo.

A las 48 horas, 7 días y 14 días se realizaron los estudios pertinentes para evaluar la respuesta inflamatoria.

Como metodología eutanásica seguimos los estándares dictados por las normas ISO en experimentación animal; la eutanasia se realizó con pentobarbital sódico (iv) 1 g/20 kg.

### **Células madre**

Se trasplantaron dos líneas celulares de origen pulpar dental deciduo, y una de pulpa dental adulta.

Se obtienen del Laboratorio de Ingeniería Tisular de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, a partir de dientes exodonciados que conserven el paquete vasculonervioso pulpar intacto. Se extrae la pulpa de las piezas dentarias y se realiza una digestión mediante colagenasa y centrifugación de la misma. Conseguimos la proliferación celular en medio de cultivo MEM reconstituido con suero fetal bovino, glutamina y antibióticos. Los cultivos se incuban en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Las células que usaremos se encontraron en el sexto y décimo pase.

### **Control positivo**

Usamos como control positivo, buscando una reacción inflamatoria franca, células diferenciadas provenientes de la línea celular MG63, que está formada por células de osteosarcoma humano de tipo osteoblástico, las cuales son ampliamente utilizadas en los estudios biológicos.

## **Control negativo**

Como control negativo, para obtener una zona con ausencia o leve respuesta inmune por parte del huésped a la que comparar al trasplante de células madre, usaremos una solución de tampón fosfato salino (PBS) que fue el vehículo utilizado para la inoculación de la células.

## **METODOLOGIA**

La inmovilización segura de los conejos se consiguió mediante la introducción de estos en "cepos o cajones de investigación" que deja la cabeza fuera.

El siguiente paso consistió en rasurado del dorso de los conejos. Posteriormente se dibujó con rotulador indeleble una cuadrícula de tres filas por tres columnas, generando nueve cuadrados de unos 9 cm<sup>2</sup> (Figura 1). Se numeró con rotulador indeleble la oreja de los conejos y sus jaulas, para evitar confusiones.

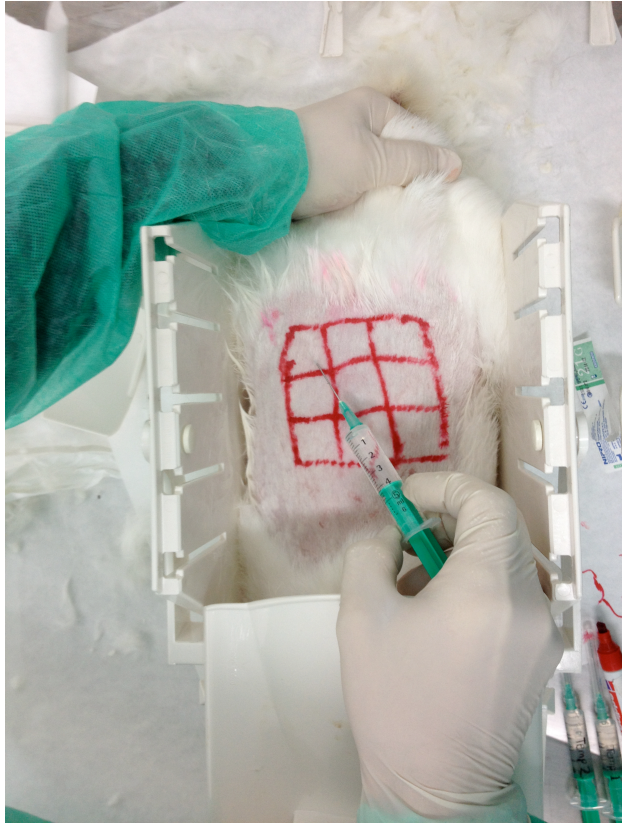


Figura 1. Cuadrícula dibujada e inoculación de las muestras.

En cada conejo se hicieron, como hemos comentado antes, nueve inoculaciones en el centro de cada uno de los cuadrados dibujados (Figura 1). Dichas inoculaciones se realizaron en tejido celular subcutáneo. Los conejos 1 y 3 recibieron, además del control negativo (PBS), el trasplante de células madre provenientes de las dos líneas de pulpa dental decidua. Los conejos 2 y 4, además de PBS, se inocularon células madre de origen pulpar adulto, y células osteoblásticas adultas diferenciadas MG 63 (Figura 2). Las células (una media de 5 millones por inoculación) se inoculan diluidas en 1ml. de PBS. Todas las inoculaciones se repiten en tres lechos distintos (columnas), que coincidirán con los tres tiempos de extracción (48 horas, 7 días, y 14 días).

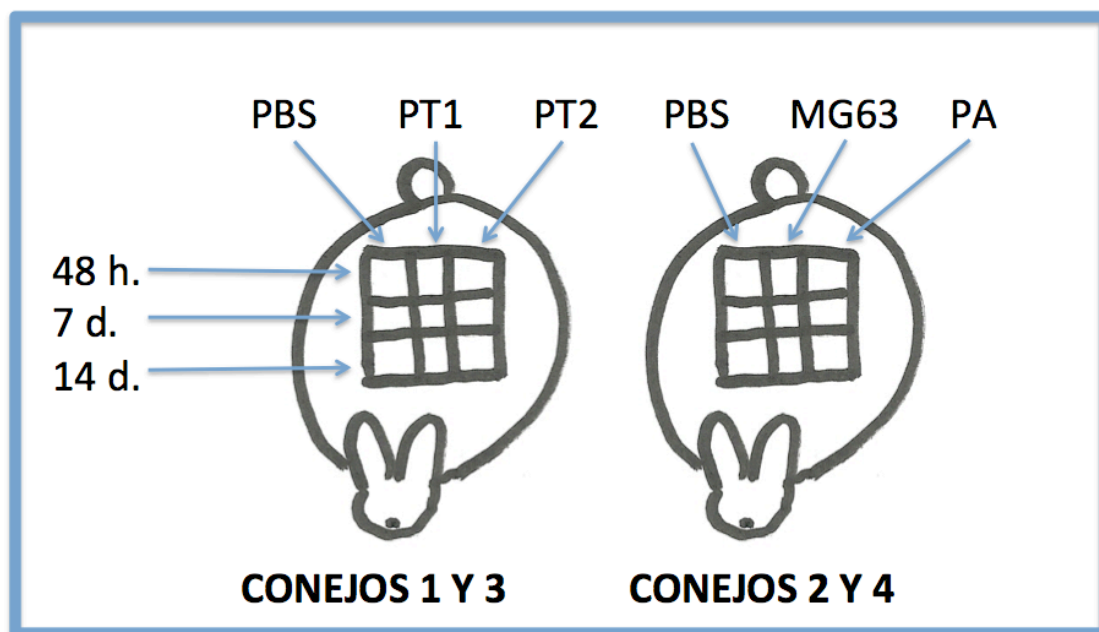


Figura 2. Esquema de inoculaciones realizadas (PT1: pulpa temporal 1; PT2: pulpa temporal 2; PA: pulpa adulta)

Se examinó cada lugar de implantación mediante lupa de bajo aumento. Se registra la naturaleza y la extensión de cualquier reacción tisular observada durante el período de estudio.

En los tiempos de extracción referidos se procedió a la anestesia local mediante infiltración de articaína 4% de los lechos correspondientes. Se obtuvieron con hoja de bisturí número 15, muestras para biopsia de piel y tejido celular subcutáneo de las áreas infiltradas. Para permitir la evaluación de la respuesta biológica local se efectúa la resección del trasplante junto con suficiente cantidad de tejido circundante no afectado. Se sutura la herida con seda 3/0.

Las muestras se mantuvieron en formaldehído al 10% refrigeradas hasta su procesamiento, que consistió en deshidratación en proporciones crecientes de etanol y a continuación inclusión en parafina. Una vez confeccionados los bloques se cortaron múltiples secciones de 3-5 micras de grosor, de manera que representan la totalidad del tejido, y se tiñeron con hematoxilina-eosina y Masson tricrómico.

### **Evaluación histológica**

Para valorar el componente inflamatorio se tomaron los siguientes criterios:

- Presencia de edema.
- Leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, según la cantidad respecto a toda la celularidad inflamatoria.
- Linfocitos: 1) linfocitos aislados, 2) grupos de linfocitos, 3) formación de folículos linfoides.
- Células plasmáticas según la cantidad respecto a toda la celularidad inflamatoria.
- Histiocitos o macrófagos: 1) histiocitos aislados, 2) nódulos histiocitarios, 3) granulomas.

Todos estos criterios se valoraron a ciegas sin conocimiento previo de la situación clínica ni de los procedimientos realizados en cada caso, por parte de un médico especialista en anatomía patológica.

Para graduar la intensidad se utilizan métodos subjetivos y semicuantitativos, expresados de la siguiente forma: (-) negativo; (+) leve; (++) moderada; (+++) intensa.

La graduación de los linfocitos se hace dando valor negativo (-) si no aparecen, leve (+) cuando aparezcan aislados, moderado (++) cuando formen nódulos e intenso (+++) si constituyen folículos linfoides.

Para los histiocitos, su presencia aislada se cuantifica como leve (+), la presencia formando nódulos se considera moderado (++) e intensa (+++) si constituyen verdaderos granulomas.

Todos los datos se reflejan en una tabla.

## Resultados

En ninguno de los tiempos se observó alteraciones macroscópicas de las zonas de infiltración.

Tras el estudio al microscopio de las muestras recogidas, por parte del patólogo, se recogieron los resultados en una tabla (Tabla 1).

		2 DÍAS	7 DÍAS	14 DÍAS
CONEJO 1	PBS	-	+	-
	T1	-	++++	-
	T2	-	+++	+
CONEJO 3	PBS	-	-	-
	T1	-	-	-
	T2	-	-	-
CONEJO 2	PBS	-	-	-
	MG 63	-	+++++++	+++
	A	-	-	-
CONEJO 4	PBS	-	-	-
	MG 63	-	++++	+++
	A	-	-	-

Tabla 1. Inflamación registrada (T1: pulpa temporal 1, T2: pulpa temporal 2, A: pulpa adulta)

Se observó la ausencia de cualquier tipo de reacción inflamatoria en las muestras recogidas a las 48 horas, independientemente del conejo o inoculación realizada.



A los 7 días es cuando aparecieron los signos de inflamación de forma más acentuada, pero solamente en las muestras que tenían el control positivo (MG 63) y en todas la inoculaciones realizadas al conejo 1, incluido el control negativo (PBS), en mayor o menor medida.

A los 14 días, se observó una inflamación residual, menos florida que la vista a los 7 días, en las muestras del control positivo y en la línea de células madre de origen de pulpa dental temporal "2" del conejo 1, siendo negativo en el resto.

Para conocer la naturaleza inflamatoria de cada muestra que mostró reacción inmunológica por parte de los huéspedes, se realizó una tabla con los criterios que se tuvieron en cuenta a la hora de valorar la inflamación (Tabla 2).

		VASOS	FIBR	PMN	LINF	C PLASM	HIST
CONEJO 1	PBS 7d	-	-	+	-	-	-
	T1 7d	+	-	+++	-	-	-
	T2 7d	-	-	++	+		-
	T2 14d	-	-	+	-	-	-
CONEJO 2	MG63 7d	+		++	+++	+	++
	MG63 14d	-	-	+	+	-	+
CONEJO 4	MG63 7d	-	-	++	+	-	+
	MG63 14d	-	-	+	+	-	+

Tabla 2. Naturaleza inflamatoria (FIBR: fibroblastos, PMN: polimorfonucleares, LINF: linfocitos, C PLASM: células plasmáticas, HIST: histiocitos)

Las inoculaciones de las células diferenciadas MG 63, produjeron una inflamación consistente fundamentalmente en presencia de linfocitos, polimorfonucleares e histiocitos, con la aparición leve de edema y células plasmáticas en algún caso aislado (Figura 3).

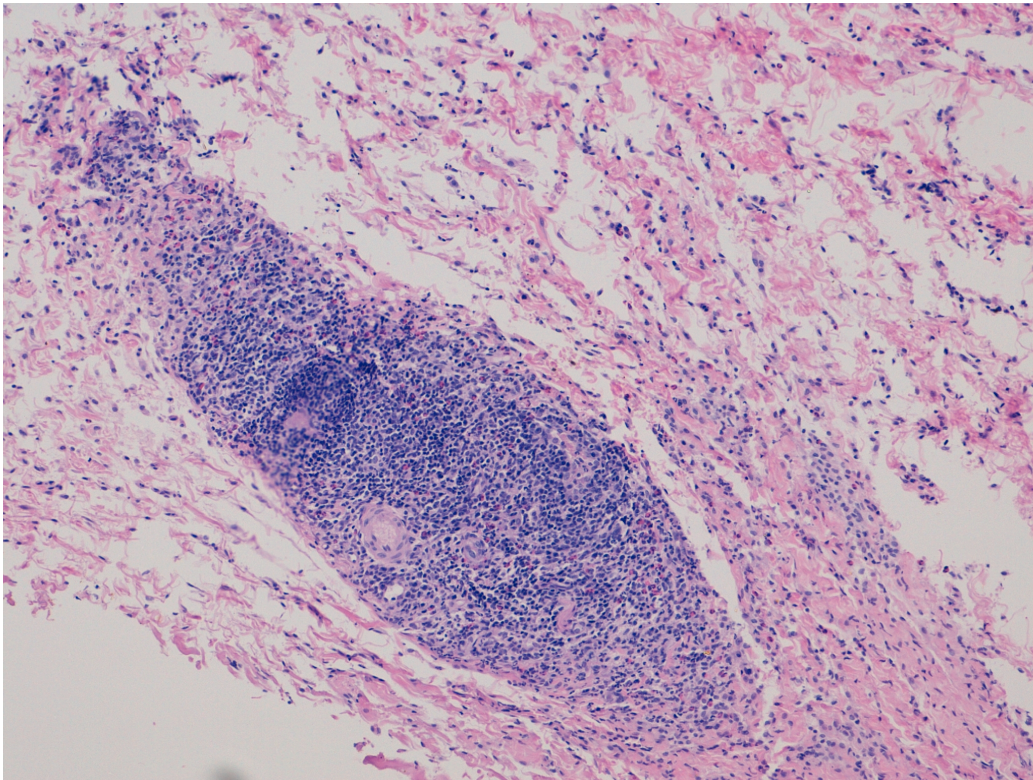


Figura 3. Reacción inflamatoria ante inoculación de células MG63 a los 7 días.

En el conejo 1, el cual mostró reacción a todas sus inoculaciones, se observaron unas reacciones inflamatorias basadas fundamentalmente en polimorfonucleares (Figura 4).

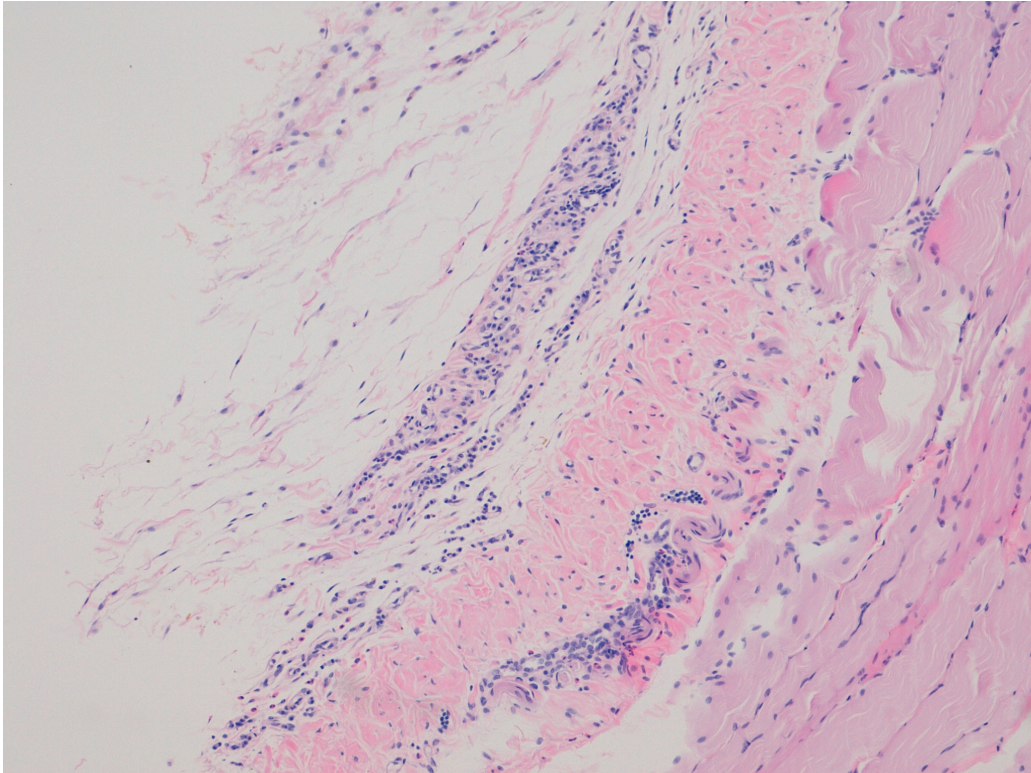


Figura 4. Reacción inflamatoria ante inoculación de células madre mesenquimales de origen de pulpa dental temporal "1" a los 7 días.

Por lo tanto, los controles negativos y positivos se comportaron como esperamos, los primeros no provocando respuesta inmune y los segundos dando lugar a una reacción inflamatoria. Las células madre mesenquimales de origen de pulpa dental no mostraron inflamación independientemente de su origen, salvo en el conejo 1, el cual mostró inflamación hasta en las muestras de PBS.

Se realizaron gráficos de cada animal, donde el eje de ordenadas corresponde a la inflamación según la puntuación de cruces (+) obtenida, y el eje de abscisas al tiempo. (Gráficos 1,2,3 y 4)

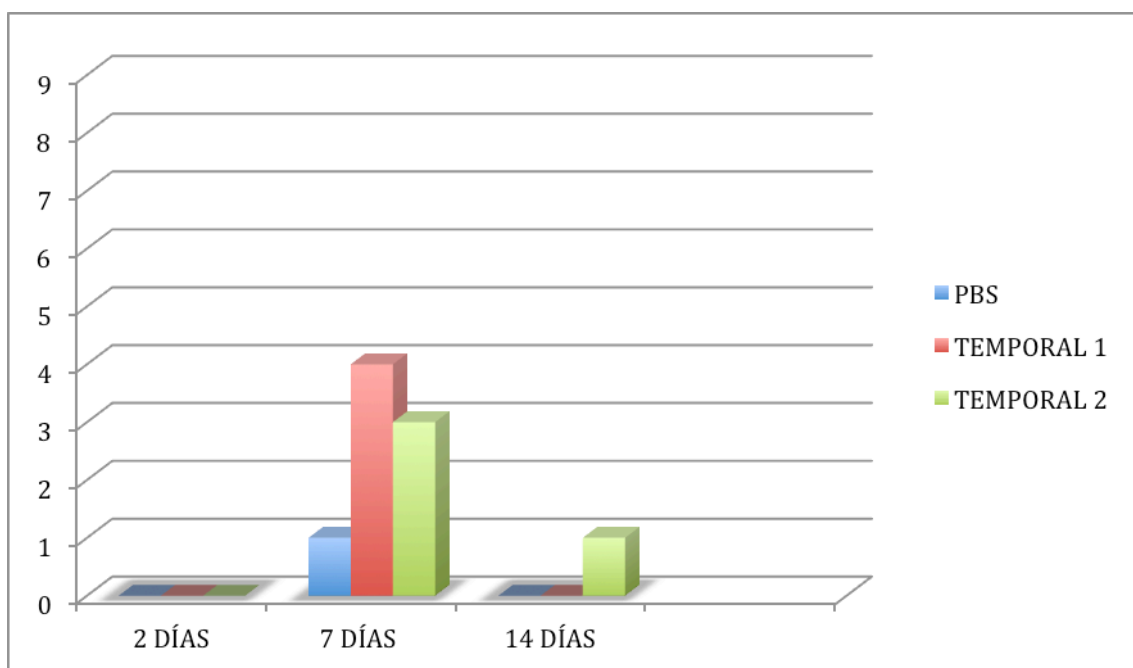


Gráfico 1: Conejo 1 (eje de ordenadas: grado de inflamación)

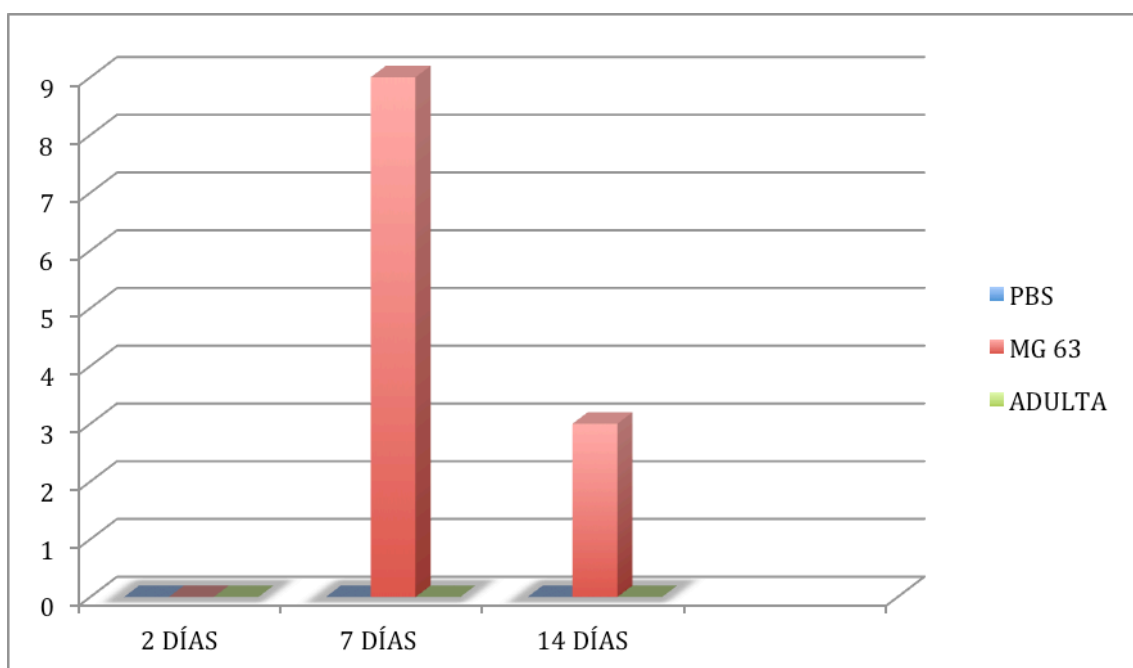


Gráfico 2: Conejo 2

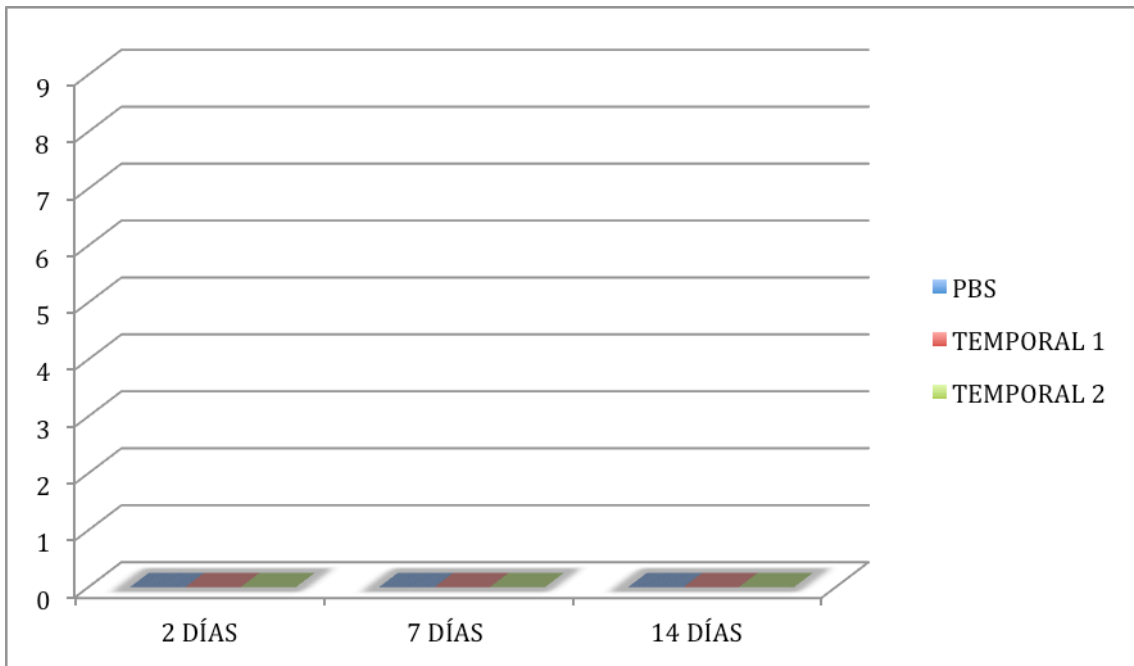


Gráfico 3: Conejo 3

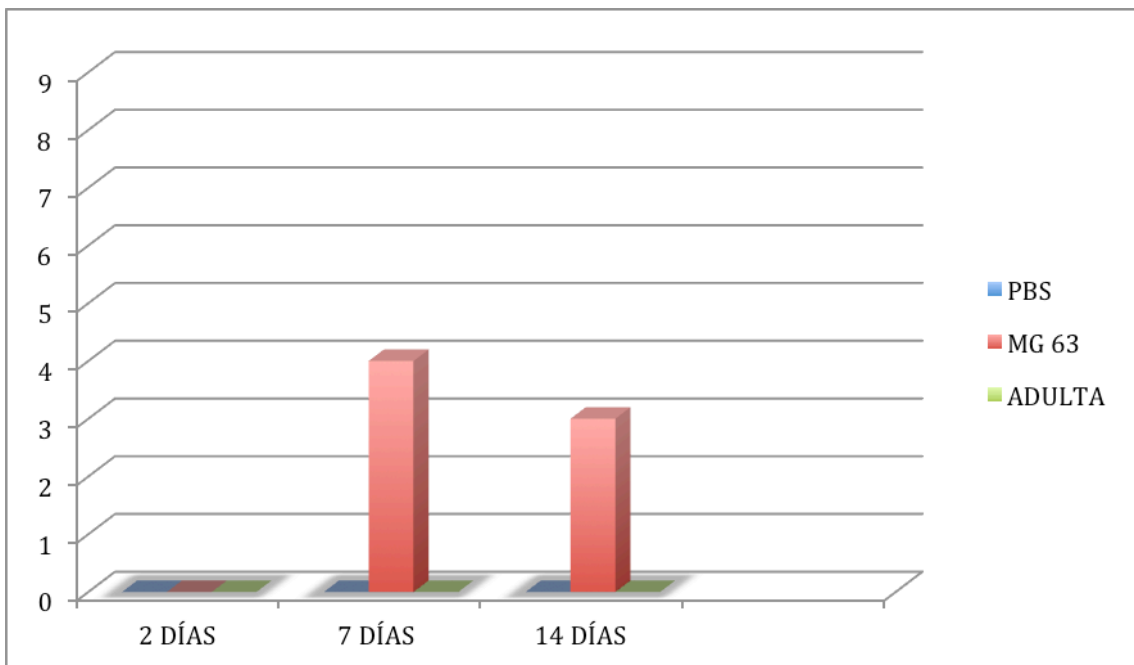


Gráfico 4: Conejo 4

## Discusión

Los dos grandes problemas de la terapia con células madre son por un lado el hipotético rechazo inmune y por el otro la promoción tumoral descrita en algunos casos.<sup>15, 21, 25</sup> La ausencia de Antígenos Leucocitario Humanos (HLA) en las membranas de la células madre mesenquimales, hace de este linaje ser potencialmente apto para el alotransplante incluso xenotransplante debido a su hipoinmunogenicidad. Ante la controversia en la literatura, y la ausencia de experimentos directamente relacionados con el tema hemos querido comprobar este hipotético rechazo por parte del sistema inmunológico. Es también importante para nosotros conocer la seguridad del trasplante de células madre humanas en un modelo animal, ya que usaremos este modelo en futuros estudios de regeneración ósea mediante terapia celular.

Tras la inoculación de células madre mesenquimales de origen de pulpa dental humana en tejido subcutáneo de conejo, pudimos observar la ausencia de reacción inflamatoria producida por parte de las células madre, observando al microscopio las mismas imágenes que producían los controles negativos (PBS) en los cortes histopatológicos. Al contrario que los controles positivos, que al ser osteoblastos maduros diferenciados, con sus MHC bien determinados, originaron una reacción inflamatoria de cierta entidad. Sólo hubo una excepción, en el conejo 1, donde tanto controles negativos como células madre mostraron cierto grado de inflamación.

Queda patente pues la tendencia de las células madre a no provocar respuesta inmunológica. Llama la atención en los resultados la falta de reacción inflamatoria en

todos los lechos donde se implantaron células madre, sin importar su origen, salvo en el conejo 1. Éste conejo respondió, en forma de reacción inflamatoria, ante el trasplante de las células madre de origen de pulpa dental temporal que se le inocularon, pero también con la simple inyección de PBS mostró leves comportamientos inflamatorios.

La falta de respuesta inmunológica por parte de otros conejos a células de los mismos linajes, unido a la reacción inflamatoria ante la inoculación del PBS, nos hace pensar que dicho conejo pudiera padecer algún trastorno que manifestara hiperreactividad ante estímulos externos, o algún tipo de exposición previa a estos estímulos. Otra explicación pudiera ser la existencia de poblaciones de células maduras diferenciadas en los cultivos de células madre, ya que no son poblaciones totalmente purificadas.

De cualquier forma, tras este estudio piloto, la actitud a seguir será la de aumentar la muestra en futuros estudios, para confirmar este hecho como excepcional, o por el contrario descubrir cierta tendencia a la reacción inmunológica ante células madre en determinados especímenes. Sólo el análisis estadístico, con suficientes datos tras un estudio definitivo, podrá determinar conclusiones rotundas.

## Conclusiones

Dentro de las limitaciones que conlleva un estudio piloto, sin análisis estadístico, podemos afirmar que las células madre mesenquimales de origen de pulpa dental humana no producen una reacción inflamatoria al ser inoculadas en conejos, salvo en ciertas condiciones de hiperreactividad que deberán ser estudiadas.



## Bibliografía

---

- <sup>1</sup> Razzouk S, Schoor R. Mesenchymal stem cells and their challenges for bone regeneration and osseointegration. *Journal of Periodontology*. 2011. Unedited.
- <sup>2</sup> Behnia H, Khojasteh A, Soleimani M, Tehranchi A, Khoshzaban A, Keshel SH, Atashi R. Secondary repair of alveolar clefts using human mesenchymal stem cells. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2009; 108 (2): 1-6.
- <sup>3</sup> Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Fini M, Aldini NN, Giardino R, Donati D, Marchetti C. Effect of mesenchymal stem cells and Platelet-Rich Plasma on the healing of standardized bone defects in the alveolar ridge: A comparative histomorphometric study in minipigs. *Journal Oral Maxillofacial Surgery*. 2009; 67: 265-72.
- <sup>4</sup> Nishimura M, Takase K, Suehiro F, Murata H. Candidates cell sources to regenerate alveolar bone from oral tissue. *International Journal of Dentistry*. 2012: 1-5. Unedited.
- <sup>5</sup> Khojasteh A, Baghaban M, Nazarian H. Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelete-rich plasma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2008; 106: 356-62.
- <sup>6</sup> Pagni G, Kaigler D, Rasperini G, Avila-Ortiz G, Bartel R, Giannobile WV. Bone repair cells for craniofacial regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012; 64: 1310-19.
- <sup>7</sup> Soleymani Y, Khojasteh A, Soleimani M, Alikhasi M, Khoshzaban A, Ahmadbeigi N. Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into a  $\beta$ -tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffold. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Patology, Oral Radiology and Endodontology*. 2008; 106: 203-9.
- <sup>8</sup> Bielby R, Jones E, McGonagle. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *INJURY, International Journal of the Care the Injured*. 2007; 38: 26-32.
- <sup>9</sup> Phinney D, Prockop D. Concise Review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: The state of transdifferentiation and modes of tissue repair - Current views. *Stemcells*. 2007; 25: 2896–2902.
- <sup>10</sup> Tamimi FM, Torres J, Tresguerres I, Clemente C, López-Cabarcos E, Blanco LJ. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss and a novel b-TCP/DCPD granulate. *Journal Clinical Periodontology* 2006; 33: 922–928.

- 
- <sup>11</sup> Torres J, Tamimi FM, Tresguerres I, Alkhraisat MH, Khraisat A, Blanco L, Lopez-Cabarcos E. Effect of Combining Platelet-Rich Plasma with Anorganic Bovine Bone on Vertical Bone Regeneration: Early Healing Assessment in Rabbit Calvariae. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*. 2009; 24(6): 123-9.
- <sup>12</sup> Torres J, Tamimi FM, Tresguerres I, Alkhraisat MH, Khraisat A, Lopez-Cabarcos E, Blanco L. Effect of Solely Applied Platelet-Rich Plasma on Osseous Regeneration Compared to Bio-Oss®: A Morphometric and Densitometric Study on Rabbit Calvaria. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 2008; 10(2): 106-12.
- <sup>13</sup> Torres J, Tresguerres I, Tamimi FM, Clemente C, Niembro E, Blanco L. Influence of Platelet-rich Plasma on Bone Regeneration: A Histomorphometric Study in Rabbit Calvaria. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*. 2007; 22(4): 563-8.
- <sup>14</sup> Chandana T, Gency PG, Cherian KM, Kavitha S. "Humanized" stem cell culture techniques: The animal serum controversy. *Stem Cells International*. 2011. Unedited.
- <sup>15</sup> Thejaswi K, Amarnath M, Srinivas G, Jerald MK, Avinash Raj T, Singh S. Immune modulatory responses of mesenchymal stem cells from different sources in cultures and in vivo. *Cell and Tissue Transplantation and Therapy*. 2012; 4 : 1-13.
- <sup>16</sup> Khojasteh A, Ghazaleh S. Current Trends in Mesenchymal stem cell application in bone augmentation: A review of the literature. *Journal Oral Maxillofacial Surgery*. 2012; 70: 972-82.
- <sup>17</sup> Rony A, Ray CJ. Concise review: Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells in cellular transplantation: Update, controversies, and unknowns. *Stem Cells Translational Medicine*. 2012; 1: 200–205.
- <sup>18</sup> Byun YK, Kim KH, Kim SH, Kim YS, Koo KT, Kim TI, Seol YJ, Ku Y, Rhyu IC, Lee YM. Effects of immunosuppressants, FK506 and cyclosporin A, on the osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Journal of Periodontal Implant Science*. 2012; 42: 73-80.
- <sup>19</sup> López N, González I. Células madre pluripotentes humanas I. *Revista Medicina Universidad de Navarra*. 2003; 47(3): 34-42.
- <sup>20</sup> Zong C, Xue D, Yuan W, Wang W, Shen D, Tong X, Shi D, Liu L, Zheng Q, Gao C, Wang J. Reconstruction of rat calvarial defects with human mesenchymal stem cells and osteoblast-like cells in poly-lactic-co-glycolic acid scaffolds. *European Cells and Materials*. 2010; 20: 109-20.
- <sup>21</sup> Farida D, Pascale P, Claire B, Philippe T. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *BLOOD*. 2003; 102(10).

- 
- <sup>22</sup> Schubert T, Poilvache H, Galli C, Gianello P, Dufrane D. Galactosyl-knock-out engineered pig as a xenogenic donor source of adipose MSCs for bone regeneration. *Biomaterials*. 2013: 1-11.
- <sup>23</sup> Pisciotta A, Riccio M, Carnevale G, Beretti F, Gibellini L, Maraldi T, Cavallini GM, Ferrari A, Bruzzesi G, De Pol A. Human serum promotes osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro and in vivo. *PLOS ONE*. 2012; 7(11).
- <sup>24</sup> Castillo HP. Células madre de pulpa dental. *Revista Asociación Dental Mexicana Estudiantil*. 2012; 1: 6-9.
- <sup>25</sup> Tan Z, Su Z, Wu R, Gu B, Liu Y, Zhao X, Zhang M. Immunomodulative effects of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells in vivo and in vitro. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*. 2011; 12(1): 18-27.
- <sup>26</sup> Yuan W, Zong C, Huang Y, Gao Y, Shi D, Chen C, Liu L, Wang J. Biological, immunological and regenerative characteristics of placenta-derived mesenchymal stem cell isolated using a time gradient attachment method. *Stem Cell Research*. 2012; 9: 110-23.